

MIKROPROPAGACIJA SLABO BUJNE PODLOGE ZA KRUŠKU PYRODWARF

Tatjana Vujović¹, Đurđina Ružić¹, Radosav Cerović²

Izvod: U radu je prikazan protokol za mikropropagaciju *in vitro* slabo bujne podloge za krušku Pyrodwarf. U cilju razvijanja protokola za brzu i efikasnu mikropropagaciju ovog genotipa, ispitan je uticaj promene koncentracije BAP i/ili vrste auksina (IBA ili NAA) na parametre multiplikacije, svežu i suhu masu izdanaka, kao i uticaj vrste auksina na parametre ožiljavanja. Povećanje koncentracije BAP sa 0,5 na 1 mg l⁻¹ i promena vrste auksina (NAA, umesto IBA) uticali su na značajno povećanje regenerativne sposobnosti izdanaka naročito izražene kroz indeks multiplikacije. U fazi ožiljavanja utvrđeno je da je efikasnost rizogeneze izražena kroz sve parametre veća na medijumu sa IBA, nego na medijumu sa istom koncentracijom NAA. U uslovima „mist“ izmaglice procenat aklimatizacije izdanaka ožiljenih *in vitro* je iznosio 90,9%.

Ključne reči: *Pyrus communis* L., *in vitro*, aseptična kultura, multiplikacija, ožiljavanje

Uvod

Optimizacija protokola za mikropropagaciju kruške započeta je krajem 70-tih godina XX veka i do danas je objavljen veliki broj radova kojima je obuhvaćeno preko 20 genotipova u okviru 7 vrsta roda *Pyrus* (Bell i Reed, 2002.). Prevladavajuće su ispitivane sorte i podloge evropske kruške (*P. communis* L.). U fazi multiplikacije je najčešće korišćen N⁶-benzil-aminopurin (BAP) samostalno (Predieri i Govani, 1998., Reed i sar., 2013.), u kombinaciji sa indol-3-butenom kiselinom (IBA) (Yeo i Reed, 1995., Sedlak i Paprstein, 2003., Ružić i sar., 2011.), ili α-naftil sirćetnom kiselinom (NAA) (Baviera i sar., 1989.). Uporedna izučavanja uticaja različitih citokina na multiplikaciju kruške su pokazala da je BAP efikasniji od tidiazurona (TDZ) kod sorte Koporecka (Sedlak i Paprstein, 2003.), podloge za krušku Pyrodwarf (Ružić i sar., 2011.), zeatina kod sorti Conference i Williams (Gatti i Predieri, 2002.), ali i da primenjen u visokim koncentracijama može dovesti do pojave vitifikacije kod sorata Conference i Doyenne d'Hiver (Predieri i Govani, 1998.). Pored izučavanja uticaja različitih biljnih regulatora rasteća na multiplikaciju, izučavan je i njihov uticaj na rizogenezu *in vitro*. Reed (1995.) je izučavajući uticaj NAA i IBA na ožiljavanje 32 sorte evropske kruške pokazala da su, iako se ova dva auksina mogu koristiti za rizogenezu kod većine sorata, bolji rezultati postignuti sa IBA. Ispitivan je i uticaj različitih izvora ugljenika (Ružić i sar., 2008.) i nekih alternativnih supstanci kao što su imidazol fungicidi (Ružić i sar., 2009.), jasmonska kiselina (Ružić i sar., 2015.) na različite faze mikropropagacije kruške. Međutim, iako se već duži niz godina mikropropagacija kruške primenjuje u velikom broju istraživačkih i komercijalnih laboratorija u svetu, još uvek postoji niz neželjenih pojava u *in vitro* propagaciji ove vrste (nizak indeks multiplikacije, hiperhidričnost, pojava abnormalnosti morfologije listova, apikalna nekroza, pojava

¹Institut za voćarstvo, Kralja Petra I br. 9, 32000 Čačak, Srbija (tatjanal@ftn.kg.ac.rs);

²Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, Karnegijeva 4, 11120 Beograd, Srbija.

dormantnosti vrhova izdanaka i sl.) koje mogu znatno uticati na kvalitet izdanaka, efikasnost proizvodnje i cenu koštanja ovako proizvedenih biljaka (Marino i Molendini, 2005.).

U ovom radu je prikazan protokol za mikropropagaciju slabo bujne podloge za krušku Pyrodwarf, a optimizacija protokola je izvršena ispitivanjem uticaja koncentracije BAP i vrste auksina na kapacitet za multiplikaciju i ožiljavanje ovog genotipa.

Materijal i metode rada

Grančice slabo bujne podloge za krušku Pyrodwarf (*Pyrus communis* L.) sa pupoljcima u fazi dormancije (januar) su odsecane i postavljane na kretanje u laboratorijskim uslovima, na sobnoj temperaturi. Po aktivaciji (otvaranju), vegetativni pupoljci su skidani sa grančica, isprani u protočnoj vodi (1,5–2 h), zatim u 70% etanolu (1' 20"), 10% varikini (12') i 3 puta u sterilnoj vodi. Pupoljci (0,3–0,8 cm) su izolovani pod stereomikroskopom i postavljani na MS medijum (Murashige i Skoog, 1962.) sa 2 mg l⁻¹ BAP, 0,5 mg l⁻¹ IBA i 0,1 mg l⁻¹ giberelne kiseline (GA₃). Praćeni su parametri uspešnosti uspostavljanja aseptične kulture: procenat eksplantata koji je inicirao rozetu, kontaminiran i nekrotirao. U cilju optimizacije mikropropagacije, ispitan je uticaj koncentracije BAP i vrste auksina (IBA ili NAA) na multiplikaciju i kvalitet izdanaka u 5. supkulturi. Korišćene su sledeće kombinacije biljnih regulatora rastenja: M1 – BAP 0,5, IBA 0,1 i GA₃ 0,1 mg l⁻¹; M2 – BAP 0,5, NAA 0,1 i GA₃ 0,1 mg l⁻¹; M3 – BAP 1, IBA 0,1 i GA₃ 0,1 mg l⁻¹; M4 – BAP 1, NAA 0,1 i GA₃ 0,1 mg l⁻¹. Na svaki medijum je postavljeno 48 izdanaka (6 Erlenmayer posuda x 4 izdanka x 2 ponavljanja). Izdanci su dva puta subkultivisani na medijumu istog hormonskog sastava, pa su svi praćeni parametri determinisani u 2. subkulturi koja je trajala 20 dana. Praćeni su sledeći parametri multiplikacije: indeks multiplikacije, dužina i broj listova osovinskog i bočnih izdanaka, ali i specifične pojave, kao što su konzistencija i boja kalusa, obojenost i položaj listova, pojava hloroze, nekroze i dr. Takođe je merena sveža i suva masa izdanaka, odnosno njihovih delova, kalusa, stabla i listova. U svrhu određivanja suve mase izdanci su sušeni 48 h na 65 °C.

U fazi ožiljavanja je korišćen MS medijum sa mineralnim solima smanjenim na 1/2, sa 1 mg l⁻¹ IBA (medijum R1) ili 1 mg l⁻¹ NAA (medijum R2) u kombinaciji sa 0,1 mg l⁻¹ GA₃. Supkultura je trajala 28 dana i praćeni su sledeći parametri: procenat ožiljavanja, prosečan broj i dužina korenova i dužina ožiljenih biljaka. Na svaki medijum je postavljeno po 40 izdanaka (4 Erlenmayer posude x 5 izdanaka x 2 ponavljanja).

Kulture su gajene u klimatizovanoj prostoriji sa kontrolisanom temperaturom (23±1°C), fotoperiodom (16/8 h, svetlost/mrak) i intenzitetom svetlosti od 8,83 Wm⁻².

Dobijeni rezultati su obrađeni statistički, analizom varijanse (ANOVA) i Dankanovim testom višestrukih intervala, za p < 0,05.

Rezultati istraživanja i diskusija

Uspešno uspostavljanje aseptične kulture je jedan od prvih kritičnih koraka u *in vitro* razmnožavanju biljaka. Procedura površinske sterilizacije upotrebljena u ovom eksperimentu (70% etanol i 10% varikina kao izvor aktivnog hlora) je dala zadovoljavajuće rezultate u odnosu na procenat eksplantata koji je inicirao lisnu rozetu (60,4%). Procenat kontaminiranih eksplantata je iznosio 25,0%, a nekrotiranih svega 14,6%.

U fazi multiplikacije promena hormonskog sastava medijuma kod podloge za krušku Pyrodwarf je dovela do značajnog povećanja indeksa multiplikacije, kao i drugih parametara multiplikacije i kvaliteta izdanaka. Pri istom sadržaju BAP, vrsta auksina je imala značajan uticaj na indeks multiplikacije ovog genotipa (Tabela 1). Na medijumima sa 0,5 mg l⁻¹ BAP statistički značajno veći indeks multiplikacije je dobijen u kombinaciji sa IBA (1,89), a na medijumima sa 1 mg l⁻¹ BAP veći indeks multiplikacije je postignut u kombinaciji sa NAA (2,28). Najoptimalniji hormonski sastav medijuma u ovoj fazi mikropropagacije je bio BAP 1, NAA 0,1 i GA₃ 0,1 mg l⁻¹. Izdanci multiplicirani na ovom medijumu su se odlikovali tankim stablom, izduženim internodijama, naročito u središnjem delu izdanaka, i sa velikim brojem listova (Slika 1d). Yeo i Reed (1995.) su kod podloge za krušku OH x F230 takođe dobili veći indeks multiplikacije na medijumu koji je sadržavao 1 mg l⁻¹ BAP u kombinaciji sa 0,1 mg l⁻¹ NAA u odnosu na 0,1 mg l⁻¹ IBA, ali pri povećanju koncentracije ovog citokinina na 2 mg l⁻¹ taj odnos je bio obrnut. Na osnovu opsežne analize pomenuti autori su zaključili da prisustvo niskih koncentracija auksina ($\leq 0,1$ mg l⁻¹) ima stimulativni efekat na mikropropagaciju kruške, a da vrsta auksina koja je najpogodnija za multiplikaciju zavisi prevashodno od genotipa.

Istraživanja uticaja biljnih regulatora rastanja na multiplikaciju i rastenje su pokazala da je BAP visoko efikasan citokinin za multiplikaciju kruške (Sedlak i Paprstein, 2003., Ružić i sar., 2011.). Takođe, utvrđeno je postojanje pozitivne korelacije između koncentracije BAP i indeksa multiplikacije kod mnogih predstavnika ovog roda kao što *P. pyrifolia* (Thakura i Kanwar, 2008.), kao i kod vegetativnih podloga za krušku OPR 157, OPR 260, OH x F230 (Yeo i Reed, 1995.). Povećanje indeksa multiplikacije sa povećanjem koncentracije BAP je međutim u većini slučajeva bilo praćeno smanjenjem dužine izdanaka, tako da se optimalna koncentracija ovog citokinina za uspešnu mikropropagaciju različitih genotipova kretala od 1–2 mg l⁻¹. Povećanje koncentracije BAP nije statistički značajno uticalo na promenu dužine izdanaka podloge Pyrodwarf iako su nešto veće vrednosti dužine osovinskog i bočnih izdanaka dobijene na medijumima sa 1 mg l⁻¹ BAP (Tabela 1). Pri povećanju koncentracije BAP primenjena koncentracija auksina je verovatno bila dovoljna da eliminiše supresivni efekat citokinina na izduživanje izdanaka. Izdanci gajeni na ovim medijumima su bili slične morfologije, kalus je bio mali, čvrst, nodularne strukture, svetlo žute boje (Slika 1c i 1d). Broj listova osovinskog izdanaka nije bio u korelaciji sa dužinom izdanaka, a najmanja vrednost za ovaj parametar (15,8) dobijena na medijumu sa BAP 1, NAA 0,1 i GA₃ 0,1 mg l⁻¹ (Tabela 1, Slika 1a). Broj listova bočnih izdanaka je mao najnižu vrednost (5,0) kod izdanaka sa najmanjom dužinom gajenih na M2 medijumu sa BAP 0,5, NAA 0,1 i GA₃ 0,1 mg l⁻¹ (Slika 1b).

Sveža i suva masa kalusa je kod ovog genotipa imala veće vrednosti kod izdanaka gajenih na medijumima sa IBA (medijumi M1 i M3) u odnosu na odgovarajuće medijume sa NAA (medijumi M2 i M4), ali su te vrednosti bile statistički značajno različite samo na medijumima sa nižom koncentracijom BAP (Tabela 2). Najveće vrednosti sveže i suve mase osovinskog izdanaka su dobijene na medijumu sa BAP 0,5, IBA 0,1 i GA₃ 0,1 mg l⁻¹. Izdanci su na ovom medijumu bili ujednačeni, sa jakim stablom i izuzetno širokim, tamnozelenim listovima, što je i rezultiralo u visokim vrednostima ovih parametara vegetativnog rasta (Slika 1a). Sveža masa bočnih izdanaka je imala najveće vrednosti na medijumima sa 1 mg l⁻¹ BAP bez obzira na vrstu auksina, na kojima su uočeni dugački bočni izdanci sa dobro formiranim listovima (Slika 1c i 1d).

Tabela 1. Parametri multiplikacije izdanaka podloge za krušku Pyrodwarf

Table 1. Multiplication parameters of shoots of pear rootstock Pyrodwarf

Oznaka medijuma Medium designation	Indeks multiplikacije Multiplication index	Dužina osov. izdanaka (cm) Length of axial shoot (cm)	Dužina boč. izdanaka (cm) Length of lateral shoots (cm)	Br. listova osov. izdanaka No. of axial shoot leaves	Br. listova boč. izdanaka No. of lateral shoot leaves
M1	1,89 ab ¹	1,87 ab	1,21 a	15,8 b	7,5 a
M2	1,27 c	1,63 b	0,85 b	17,4 a	5,0 b
M3	1,78 b	2,09 a	1,27 a	17,6 a	7,5 a
M4	2,28 a	2,00 ab	1,35 a	16,7 a	7,4 a

¹Prosečne vrednosti u istoj koloni koje su obeležene različitim slovima su statistički značajno različite ($p \leq 0,05$)

¹Mean values followed by different letters are significant different at $p \leq 0.05$

Tabela 2. Sveža i suva masa kalusa i izdanaka podloge za krušku Pyrodwarf

Table 2. Fresh and dry weight of callus and shoots of pear rootstock Pyrodwarf

Oznaka medijuma Medium designation	Sveža masa izdanaka (mg) Fresh weight of shoots (mg)			Suva masa izdanaka (mg) Dry weight of shoots (mg)		
	Kalus Callus	Osov. izdanak Axial shoot	Boč. izdanak Lateral shoot	Kalus Callus	Osov. izdanak Axial shoot	Boč. izdanak Lateral shoot
M1	37,3 a ¹	151,3 a	35,7 b	7,3 a	32,7 a	6,5 ab
M2	29,0 b	125,0 b	29,8 c	6,1 b	27,3 ab	5,5 c
M3	39,3 a	123,7 b	41,5 a	6,7 ab	22,5 b	6,0 bc
M4	35,0 ab	137,8 ab	40,5 ab	6,3 b	30,1 a	6,8 a

¹Prosečne vrednosti u istoj koloni koje su obeležene različitim slovima su statistički značajno različite ($p \leq 0,05$)

¹Mean values followed by different letters are significant different at $p \leq 0.05$

Tabela 3. Parametri ožiljavanja podloge za krušku Pyrodwarf

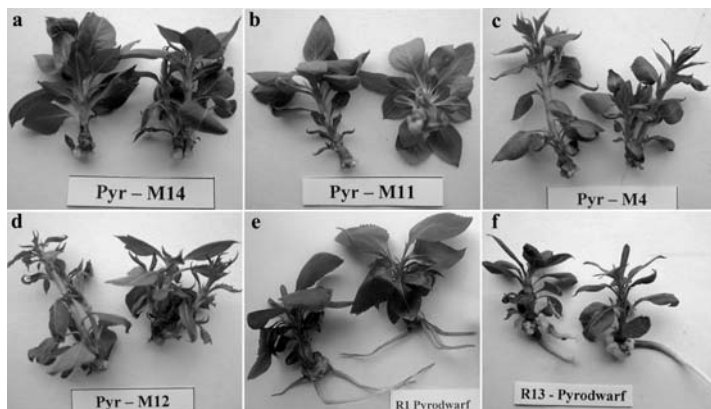
Table 3. Rooting parameters of Pyrodwarf pear rootstock

Oznaka medijuma Medium designation	% ožiljavanja % of rooting	Broj korenova No. of roots	Dužina korenova (cm) Root length (cm)	Dužina biljaka (cm) Shoot length (cm)
R1	90,0 a ¹	4,4 a	2,08 a	1,89 a
R2	40,0 b	1,1 b	1,48 b	1,26 b

¹Prosečne vrednosti u istoj koloni koje su obeležene različitim slovima su statistički značajno različite ($p \leq 0,05$)

¹Mean values followed by different letters are significant different at $p \leq 0.05$

Ispitivanje uticaja vrste auksina na ožiljavanje kod podloge za krušku Pyrodwarf u ovom radu je pokazalo da je efikasnost rizogeneze izražena kroz sve parametre ožiljavanja veća na medijumu sa IBA, nego na medijumu sa istom koncentracijom NAA (Tabela 3). Reed (1995.) je takode, testirajući 49 vrsta roda *Pyrus*, utvrdila da je kod 44% genotipova IBA efikasnija od NAA, sa procentima ožiljavanja koji su bili veći od 50%, dok je kod samo 8% genotipova (4 sorte *P. communis* L.) situacija bila obrnuta. Takođe je uočila da je povećanje procenta ožiljavanja u prisustvu IBA kod svih genotipova bilo praćeno povećanjem obrazovanja kalusa u osnovi izdanaka, kao i povećanjem krtosti tako obrazovanih korenova. Pojava velikih kalusa je uočena i kod podloge Pyrodwarf, nezavisno od vrste upotrebljenog auksina, a kratki, krti korenovi su bili u većem stepenu zastupljeni kod tretmana sa NAA (Slika 1e i 1f). U uslovima „mist“ izmaglice uspešno je aklimatizovano 90,9% ožiljenih izdanaka ovog genotipa. Procenat aklimatizacije izdanaka kod kojih nije indukovana rizogeneza je bio značajno niži i iznosio svega 55,2%.



Slika 1. Izdanci podloge Pyrodwarf u fazi multiplikacije: medijumi sa 0,5 mg l⁻¹ BA u kombinaciji sa 0,1 mg l⁻¹ IBA (a) ili NAA (b) i 1 mg l⁻¹ BA u kombinaciji sa 0,1 mg l⁻¹ IBA (c) ili NAA (d); u fazi ožiljavanja: medijum sa 1 mg l⁻¹ IBA (e) i 1 mg l⁻¹ NAA (f)
 Figure 1. Shoots of Pyrodwarf rootstock in multiplication stage: media containing 0,5 mg l⁻¹ BA combined with 0,1 mg l⁻¹ IBA (a) or NAA (b) and 1 mg l⁻¹ BA combined with 0,1 mg l⁻¹ IBA (c) or NAA (d); in rooting stage: medium with 1 mg l⁻¹ IBA (e) and 1 mg l⁻¹ NAA (f)

Zaključak

Dobijeni rezultati pokazuju da prikazani protokol za razmnožavanje slabo bujne podloge za krušku, uz neznatna usavršavanja faze multiplikacije i ožiljavanja, uvođenjem novih regulatora rastanja i/ili variranjem njihove koncentracije, može naći širu primenu u komercijalnim *in vitro* laboratorijama.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekata TR-20013 i TR-31064 finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS.

Literatura

- Bell R.L., Reed B.M. (2002). *In vitro* tissue culture of pear; advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. Acta Horticulturae, 596, 412–418.
- Gatti E., Predieri S. (2002). Standard and compact pear clones *in vitro* sensitivity to cytokinins. Acta Horticulturae, 596, 473–476.
- Marino G., Molendini L. (2005). *In vitro* leaf-shoot regeneration and somaclone selection for sodium chloride tolerance in quince and pear. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 80, 561–570.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A resived medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473–497.
- Predieri S., Govoni M. (1998). *In vitro* propagation of compact pear clones. Acta Horticulturae, 475, 127–134.

- Reed B. (1995). Screening *Pyrus* germplasm for *in vitro* rooting response. HortScience, 30 (6), 1292–1294.
- Reed B.M., Denoma J., Wada S., Postman J. (2013). Micropropagation of pear (*Pyrus* sp.). Methods in Molecular Biology, 11013, 3–18.
- Ružić Đ., Lazić T., Cerović R. (2008). Micropropagation of some *Prunus* and *Pyrus* genotypes *in vitro* as affected by different carbon sources. Acta Horticulturae, 795, 413–418.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R., Kuzmanović M. (2009). The influence of imidazole fungicides on multiplication *in vitro* of low vigorous pear and cherry rootstocks. Acta Horticulturae, 839, 79–86.
- Ružić Đ., Vujović T., Nikolić D., Cerović R. (2011). *In vitro* growth responses of the ‘Pyrodwarf’ pear rootstock to cytokinin types. Romanian Biotechnological Letters, 16 (5), 6630–6637.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R. (2015). Potential application of jasmonic acid in *in vitro* rooting of low vigorous pear and cherry rootstocks. Acta Horticulturae, 1099, 895–900.
- Sedlak J., Paprstein F. (2003). Influence of growth regulators on *in vitro* propagation of *Pyrus communis* cv. Koporecka. Acta Horticulturae, 616, 379–382.
- Thakura A., Kanwar J.S. (2008). Micropropagation of wild pear *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai. I. Explant establishment and shoot multiplication. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 36 (1), 103–108.
- Yeo D.Y., Reed B. (1995). Micropropagation of three *Pyrus* rootstock. HortScience, 30 (3), 620–623.

MICROPROPAGATION OF LOW VIGOROUS PEAR ROOTSTOCK PYRODWARF

Tatjana Vijović¹, Đurđina Ružić², Radosav Cerović³

Abstract

The paper describes the protocol for micropropagation *in vitro* of low vigorous pear rootstock Pyrodwarf. Aiming at developing efficient protocol for micropropagation of this genotype, the influence of BAP concentration and/or type of auxins (IBA or NAA), on multiplication index, fresh and dry weight of shoots was examined. The effect of type of auxins on rooting parameters was monitored as well. Increase in BAP concentration from 0.5 to 1 mg l⁻¹ in combination with NAA instead of IBA significantly increased regeneration capacity of shoots, especially multiplication index. Shoots rooted on medium with IBA displayed significantly higher capacity for rhizogenesis, in comparison with those grown on medium containing NAA at equal concentration. The percentage of acclimatization under the ‘mist’ system in green house was 90,9% for shoots rooted *in vitro*.

Key words: *Pyrus communis* L., *in vitro*, aseptic culture, multiplication, rooting

¹Fruit Research Institut, Kralja Petra I no. 9, 3200 Čačak, Serbia (tatjanal@ftn.kg.ac.rs);

²Innovation Center, Faculty of Technology and Metallurgy, Karnegijeva 4, 11120 Belgrade, Serbia.